

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/22866 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10363

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. September 2001 (07.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 44 856.9 11. September 2000 (11.09.2000) DE

(71) Anmelder: PIKA WEIHENSTEPHAN GMBH  
[DE/DE]; Alte Akademie 3, 85350 Freising-Wei-  
henstephan (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOGESER, Gudrun  
[DE/DE]; Zum Annesberg 22, 85276 Pfaffenhofen (DE).

(74) Anwalt: KADOR & PARTNER; Corneliusstrasse 15,  
80469 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND SAMPLING KIT FOR ANALYSING MATERIAL CONTAINING NUCLEIC ACID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND PROBENKIT ZUR ANALYSE VON NUCLEINSÄUREHALTIGEM MATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for analysing material containing nucleic acid. Said material is deposited on a filter material and the filter material is dissolved in a solvent. The inventive method is characterised in that the material containing nucleic acid is disintegrated on the filter material. The invention also relates to a sampling kit for carrying out said method. The inventive method and the sampling kit can be used to analyse all types of sample containing nucleic acid.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, das das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf einem Filtermaterial und das Auflösen des Filtermaterials in einem Lösungsmittel umfasst und dadurch gekennzeichnet ist, dass das nucleinsäurehaltige Material auf dem Filtermaterial aufgeschlossen wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens. Das erfindungsgemässe Verfahren sowie der Probenkit können zur Analyse von nucleinsäurehaltigen Proben aller Art eingesetzt werden.

WO 02/22866 A2

## **Verfahren und Probenkit zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, das das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf einem Filtermaterial und das Auflösen des Filtermaterials in einem Lösungsmittel umfaßt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Bei der Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, beispielsweise aus flüssigen Proben, ist es von entscheidender Bedeutung, daß das nucleinsäurehaltige Material bei der Probenaufbereitung möglichst quantitativ erfaßt wird. Dies ist notwendig, damit zum Beispiel bei der Analyse eines mit Keimen behafteten Lebensmittels keine der verschiedenen Keimarten unerkannt bleibt, auch wenn sie nur in geringer Konzentration vorliegt.

Unter Standardlaborbedingungen, wie sie zum Beispiel in einem Labor zur mikrobiologischen Überwachung der Produktion von Lebensmitteln vorhanden sind, werden zur Probenaufbereitung daher die Zentrifugation oder die Membranfiltration eingesetzt.

Ein Nachteil der Zentrifugation ist jedoch, daß nicht sicher alle Organismen erfaßt werden können, so daß zum Nachweis einer Spureninfektion die Filtration die bevorzugte Methode darstellt. Bei der Filtration besteht jedoch das Problem,

daß nach dem Filtrieren die abgeschiedenen Organismen sehr fest am Filtermaterial anhaften und je nach Filtertyp fest in dessen Poren eingeschlossen sein können. Daher ist es für anschließende Untersuchungen der Organismen praktisch unmöglich, die gesammelten Organismen quantitativ wieder vom Filtermaterial abzulösen.

Für weiterführende Untersuchungen entstehen daher sowohl bei der Zentrifugation als auch bei der herkömmlichen Filtration immer Verluste an Organismen, so daß eine quantitative Untersuchung aller Organismen einer Probe, sowohl bezüglich einer weiterführenden mikrobiologischen Analyse, als auch bezüglich einer anschließenden DNA-Isolierung, nicht gewährleistet ist. Die beschriebenen Nachteile bestehen auch für andere Arten nucleinsäurehaltigen Materials.

Demgemäß ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material sowie einen Probenkit zur Durchführung dieses Verfahrens bereitzustellen, das die vorstehend aufgeführten Nachteile des Standes der Technik vermeidet.

Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren sowie einen Probenkit zur Verfügung zu stellen, bei denen aus Proben von nucleinsäurehaltigem Material die Nucleinsäuren quantitativ erhalten werden.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß diese Aufgaben gelöst werden können, wenn das auf einem Filtermaterial angesammelte nucleinsäurehaltige Material auf diesem Filtermaterial aufgeschlossen wird.

Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material zur Verfügung, das das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf einem Filtermaterial und das Auflösen des Filtermaterials in einem Lösungsmittel umfaßt, worin das nucleinsäurehaltige Material auf dem Filtermaterial aufgeschlossen wird.

Des weiteren stellt die vorliegende Erfindung einen Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Verfügung, der ein Filtermaterial, eine Pufferlösung, sowie ein Hilfsmittel zur verbesserten Phasentrennung umfaßt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, Nucleinsäuren wie DNA und RNA aus nucleinsäurehaltigem Material aller Art quantitativ zu erhalten. Dadurch ist gewährleistet, daß keine Nucleinsäuren aus dem nucleinsäurehaltigen Material verloren gehen und folglich in der Analyse nicht erkannt werden.

Insbesondere ist dadurch gewährleistet, daß bei der Analyse von Spuren nucleinsäurehaltigen Materials keine Nucleinsäuren übersehen werden und ihr Gehalt in der Probe quantitativ verläßlich bestimmt werden kann.

Darüberhinaus werden die Nucleinsäuren durch das erfindungsgemäße Verfahren in hoher Reinheit erhalten.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Nucleinsäuren können für weitere Analysen, wie z.B. DNA-Hybridisierungen, Klonierungen, Polymerase Chain Reaction (PCR) etc., verwendet werden. Aufgrund der hohen Reinheit der Nucleinsäuren kann dies auch direkt ohne weitere Reinigungs- oder Aufbereitungsschritte erfolgen.

Falls die Nucleinsäurekonzentration für weitere Analyseverfahren noch zu gering sein sollte, können diese mit gängigen Konzentrationsverfahren, wie beispielsweise der alkoholischen Fällung oder mit Hilfe von nucleinsäurebindenden Säulen, noch angereichert werden.

Der erfindungsgemäße Probenkit ermöglicht eine anwenderfreundliche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf dem Filtermaterial kann aus jedem zur Filtration geeigneten Medium erfolgen. Im allgemeinen wird das nucleinsäurehaltige Material aus fluider, wie zum Beispiel flüssiger, Phase abfiltriert.

Als Filtermaterial kann jegliches Material dienen, das zum einen zum Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials geeignet ist und zum anderen in einem Lösungsmittel aufgelöst werden kann.

Bevorzugterweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren als Filtermaterial ein Polycarbonat- oder Celluloseacetatfilter eingesetzt. Polycarbonatfilter haben den

Vorteil, daß sie sich rückstandslos im geeigneten Lösungsmittel auflösen lassen, während Celluloseacetatfilter sehr preiswert sind.

Als Lösungsmittel zur Auflösung des Filtermaterials werden bevorzugt Chloroform oder Phenol eingesetzt. Dabei eignet sich Chloroform besonders zur Auflösung von Polycarbonatfiltern, Phenol besonders zur Auflösung von Celluloseacetatfiltern. Diese Lösungsmittel haben den Vorteil, daß sie die Nucleinsäuren nicht angreifen und die Filtermaterialien im Falle des Polycarbonatfilters vollständig und im Falle des Celluloseacetatfilters weitestgehend auflösen können.

Das Aufschließen des auf dem Filtermaterial abgeschiedenen nucleinsäurehaltigen Materials kann mittels aller gängigen Methoden erfolgen, wie zum Beispiel einer Behandlung mit Ultraschall oder dem Kochen der Proben im Wasserbad für mehrere Minuten.

Bevorzugterweise wird zum Aufschließen des nucleinsäurehaltigen Materials das Filtermaterial mit dem darauf abgeschiedenen nucleinsäurehaltigen Material der in einem Mikrowellengerät erzeugten Strahlung, einer Hitzebehandlung, einer Behandlung mit Ultraschall oder einem mechanischen Verfahren, wie dem Rühren oder Schütteln zusammen mit festen Partikeln, ausgesetzt. Dadurch lassen sich beispielsweise bei zellhaltigem Material die Zellwände schnell und quantitativ aufschließen und somit die Nucleinsäuren freisetzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material aller Art, wie zum Beispiel Material, das Mikroorganismen wie Hefen und Bakterien, Pilze, Viren, Algen oder pflanzliches Material umfaßt, verwendet werden.

Bevorzugt ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, das Organismen umfaßt.

Diese Organismen können nach dem Abscheiden auf dem Filtermaterial vor dem Aufschließen noch mit weiteren Methoden bearbeitet werden. Dies kann zum einen so geschehen, daß zur Erhöhung der Anzahl der Organismen diese auf festen oder in flüssigen Nährmedien bebrütet werden. Damit kann eine Verbesserung der Nachweisgrenzen dieser Organismen erreicht werden.

Die auf dem Filtermaterial befindlichen Organismen können vor dem Aufschluß auch mikroskopiert und/oder mit Farbstoffen angefärbt werden. Als Farbstoffe können dabei beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden.

Durch das Mikroskopieren und/oder Anfärben der Organismen, kann beispielsweise festgestellt werden, ob die auf dem Filtermaterial angesammelten Organismen lebend oder tot sind. Nach der Untersuchung auf ihre Lebensfähigkeit können die Organismen mit molekularbiologischen Methoden weiter differenziert werden. Dabei stellt es einen besonderen Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens dar, daß die Differenzierung mit molekularbio-

logischen Methoden genau die selben Organismen betrifft, die vorher mikroskopiert und/oder durch Anfärbung analysiert wurden.

Nach dem Auflösen des Filtermaterials können die Nucleinsäuren z.B. mit Hilfe eines Puffers aus der Lösung extrahiert werden. Dazu wird eine mit der Lösung nicht mischbare Pufferphase zur Lösung hinzugegeben.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zu dem zweiphasigen System ein Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung eingesetzt. Dies ist bevorzugterweise ein Phase-Lock-Gel wie es von der Firma Eppendorf vertrieben wird.

Die sich in der Pufferphase befindenden Nucleinsäuren können direkt zum Beispiel in die PCR eingesetzt werden. Für den Fall, daß die Nucleinsäurekonzentration noch sehr niedrig ist, können die isolierten Nucleinsäuren mit gängigen Konzentrationsverfahren, wie zum Beispiel der alkoholischen Fällung oder mit Hilfe von nucleinsäurebindenden Säulen, noch angereichert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren und/oder der erfindungsgemäße Probenkit können zur Analyse von fluiden Medien aller Art eingesetzt werden.

Bevorzugt ist der Einsatz des Verfahrens/Probenkits dort, wo fluide Medien wie zum Beispiel Flüssigkeiten analysiert werden sollen, die über einen längeren Zeitraum oder mehrfach verwendet werden sollen.



In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren und/oder der erfindungsgemäße Probenkit zur Analyse von Brunnenwasser oder in Wasserwerken beispielsweise zur Prüfung auf E. coli und coliforme Keime, oder zur Analyse von Frischwasser, wie sie beispielsweise für Krankenhäuser oder Altenheime in regelmäßigen Abständen, zum Beispiel zur Prüfung auf Legionellen, vorgeschrieben sind, eingesetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren und/oder der erfindungsgemäße Probenkit zur Prüfung auf Krankheitserreger oder andere Verunreinigungen eingesetzt, beispielsweise zur Analyse von Blutserum, Dialyseflüssigkeiten, oder Lebensmitteln, dabei vor allem Getränken wie Bier oder Soft-Getränken und Säften.

Das Verfahren/der Probenkit kann auch zur Analyse von Flüssigkeiten aus dem technischen Bereich wie Schmierölen, Hydraulikflüssigkeiten, Reinigungslösungen, Kühlmittel, etc. verwendet werden.

Daneben ist es grundsätzlich möglich, das Verfahren/den Probenkit zum Nachweis von Beimischungen organischen Materials zu jedweden Flüssigkeiten einzusetzen, zum Beispiel der Beimischung von Apfelsaft zu Orangensaft, oder Gewässerverunreinigungen, die durch organisches Material verursacht wurden.

Der Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt:

- a) Filtermaterial zur Filtrierung einer bestimmten Anzahl an Proben mit nucleinsäurehaltigem Material,
- b) eine oder mehrere Pufferlösung(en) zur Extraktion der Nucleinsäuren, die mit dem oder den Lösungsmitteln nicht mischbar sind,
- c) ein oder mehrere Reagenz(ien) zur Verbesserung der Phasentrennung zwischen Lösungsmittel und Pufferlösung bei der Extraktion der Nucleinsäuren.

Optional können dem Kit noch ein oder mehrere Lösungsmittel zur Auflösung des Filtermaterials, sowie weitere Reagenzien zur Detektion der aus der Probe isolierten Nucleinsäuren beigelegt sein.

In diesem Probenkit ist das für die Routineanalyse von Proben, die nucleinsäurehaltiges Material enthalten und die beispielsweise auf eventuell vorhandene Kontaminationen mit Mikroorganismen mittels DNA-Analysen untersucht werden soll, notwendige Material zusammengestellt.

Vorteile des so zusammengestellten Kits sind, daß der Anwender nur noch wenige Arbeitsschritte selbst durchführen muß und somit der Arbeitsaufwand des Anwenders sowie das Fehlerrisiko durch zum Beispiel falsches Pipettieren oder Verwechseln von Proben oder Lösungen bei der Durchführung einer Analyse minimiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der erfindungsgemäße Probenkit:

- a) je einen Membranfilter pro Probe,
- b) Pufferlösungen für die Extraktion der Nucleinsäuren,
- c) Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung, wobei jeweils ein Gefäß mit der zur Bearbeitung einer Probe erforderlichen Menge pro Probe bereitgestellt wird,
- d) Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Analyse, wobei jeweils ein Gefäß mit den für die Durchführung der PCR erforderlichen Reagenzien pro Probe bereitgestellt wird,
- e) Kontrollreagenzien für die PCR, d.h. Reagenzien und Kontroll-DNA für die notwendigen Positiv-Reaktionen.

Weiter bevorzugt umfaßt das Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung ein Phase-Lock-Gel wie es von der Firma Eppendorf bezogen werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachstehend anhand eines Beispiels beschrieben.

**Beispiel 1:**

Eine Wasserprobe wird mittels Membranfiltration über einem Polycarbonat-membranfilter abfiltriert. Der Filter wird anschließend in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt. Der Inhalt dieses Gefäßes wird dann 3 Minuten lang der Strahlung einer 650 Watt starken Mikrowelle ausgesetzt. Danach werden zur Probe 200 µl Wasser und 800 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (Volumenanteil 24/1) hinzugefügt. Die Probe wird geschüttelt bis der Filter frei in der Probe schwimmt. Anschließend wird die Probe durch Überkopfschütteln bei 30 U/min 10 Minuten lang weiter geschüttelt, bis sich der Filter vollständig aufgelöst hat. Es werden dann 300 µl Phase Lock Gel der Firma Eppendorf in ein weiteres 2ml-Eppendorfgefäß gegeben. Der gesamte Inhalt des ersten Eppendorfgefäßes wird dann zum Phase Lock Gel hinzugegeben. Zur Phasentrennung wird bei 14.000 U/min 2 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend werden 150 µl der oberen Phase in ein frisches Gefäß überführt. 10 µl der so aufbereiteten Probe werden für eine PCR-Analyse mit einem Ansatzvolumen von 50 µl verwendet.

Der Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird im folgenden an einem Beispiel beschrieben:

### **Beispiel 2:**

Kit-Inhalte sind

- 50 Polycarbonat-Membranfilter, steril einzeln verpackt
- 1 Gefäß mit 5,0 ml Tris-Puffer, pH 8,5

- 1 Gefäß mit 10 ml 0,01 M Tris-EDTA-Puffer
- 50 2,0 ml-Eppendorfgeläße mit je 300 µl Phase Lock Gel
- Reagenzien zur Durchführung einer PCR, bestehend aus 2 Oligonucleotiden, dNTPs und PCR-Puffer, 48 x vordosiert in der für die Analyse je einer Probe erforderlichen Menge (50 µl), und getrocknet
- Kontrollen für die PCR, ebenfalls bereits 48 x vordosiert (Reagenzien für die PCR sowie 0,05 ng Kontroll-DNA für die Positiv-Kontrolle) und getrocknet
- Arbeitsvorschrift

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, das das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf einem Filtermaterial und das Auflösen des Filtermaterials in einem Lösungsmittel umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß das nucleinsäurehaltige Material auf dem Filtermaterial aufgeschlossen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Filtermaterial ein Celluloseacetat- oder Polycarbonat-Filter verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Filtermaterial in Phenol oder Chloroform aufgelöst wird.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zum Aufschließen des auf dem Filtermaterial abgeschiedenen nucleinsäurehaltigen Materials Mikrowellenstrahlung, Hitze, Ultraschall oder ein mechanisches Verfahren eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das nucleinsäurehaltige Material Organismen umfaßt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die auf dem Filtermaterial abgeschiedenen Organismen auf festen oder in flüssigen Nährmedien zur Erhöhung der Keimzahlen bebrütet werden

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die auf dem Filtermaterial abgeschiedenen Organismen mikroskopiert und/oder mit Farbstoffen angefärbt werden.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nucleinsäuren nach Auflösen des Filtermaterials mit einem Puffer extrahiert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nucleinsäuren nach der Extraktion direkt in der Pufferphase in die PCR eingesetzt werden.
10. Probenkit zur Ausführung des Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Filtermaterial, eine Pufferlösung und ein Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung umfaßt.
11. Probenkit nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß er als Filtermaterial einen Celluloseacetat- oder Polycarbonatfilter umfaßt.
12. Probenkit nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß er
  - a) je einen Membranfilter pro Probe,
  - b) Pufferlösungen für die Extraktion der Nucleinsäuren,
  - c) Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung, wobei jeweils ein Gefäß mit der zur Bearbeitung einer Probe erforderlichen Menge pro Probe bereitgestellt wird,

- d) Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Analyse, wobei jeweils ein Gefäß mit den für die Durchführung der PCR erforderlichen Reagenzien pro Probe bereitgestellt wird,
- e) Kontrollreagenzien für die PCR, d.h. Reagenzien und Kontroll-DNA für die notwendigen Positiv-Reaktionen

umfaßt.

13. Probenkit nach Anspruch 10, 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß er als Mittel zur Verbesserung der Phasentrennung ein Phase-Lock-Gel umfaßt.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/022866 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
C12N 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10363

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. September 2001 (07.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
00 44 856.9 11. September 2000 (11.09.2000) DE

(71) Anmelder: PIKA WEIHENSTEPHAN GMBH  
[DE/DE]; Alte Akademie 3, 85350 Freising-Wei-  
henstephan (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOGESER, Gudrun  
[DE/DE]; Zum Annesberg 22, 85276 Pfaffenhofen (DE).

(74) Anwalt: KADOR & PARTNER; Corneliusstrasse 15,  
80469 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 5. Juni 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND SAMPLING KIT FOR ANALYSING MATERIAL CONTAINING NUCLEIC ACID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND PROBENKIT ZUR ANALYSE VON NUCLEINSÄUREHALTIGEM MATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for analysing material containing nucleic acid. Said material is deposited on a filter material and the filter material is dissolved in a solvent. The inventive method is characterised in that the material containing nucleic acid is disintegrated on the filter material. The invention also relates to a sampling kit for carrying out said method. The inventive method and the sampling kit can be used to analyse all types of sample containing nucleic acid.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von nucleinsäurehaltigem Material, das das Abscheiden des nucleinsäurehaltigen Materials auf einem Filtermaterial und das Auflösen des Filtermaterials in einem Lösungsmittel umfasst und dadurch gekennzeichnet ist, dass das nucleinsäurehaltige Material auf dem Filtermaterial aufgeschlossen wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Probenkit zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens. Das erfindungsgemässe Verfahren sowie der Probenkit können zur Analyse von nucleinsäurehaltigen Proben aller Art eingesetzt werden.

WO 02/022866 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.  
PCT/EP 01/10363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12Q1/68 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STARBUCK M A B ET AL: "Ultra sensitive detection of Listeria monocytogenes in milk by the polymerase chain reaction (PCR)." LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 15, no. 6, 1992, pages 248-252, XP009005698 ISSN: 0266-8254	1,3,5-9
Y	the whole document.	2,4, 10-13
Y	WO 99 45021 A (CHO RAYMOND J ;AFFYMETRIX INC (US); DAVIS RONALD W (US); WODICKA L) 10 September 1999 (1999-09-10) page 16, line 9 - line 12	10-13
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2003

Date of mailing of the international search report

26/02/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luzzatto, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/EP 01/10363

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 187 083 A (MULLIS KARY B) 16 February 1993 (1993-02-16) column 14, line 21 - line 27; claims 1-5,21-23; example 4 —	2, 4
A	US 5 654 179 A (LIN LILY) 5 August 1997 (1997-08-05) column 14, line 9 - line 47 —	1-9
E	WO 02 12560 A (GALLO WINERY E & J) 14 February 2002 (2002-02-14) the whole document —	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern Application No

PCT/EP 01/10363

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9945021	A	10-09-1999	AU 2892199 A	20-09-1999
			WO 9945021 A1	10-09-1999
US 5187083	A	16-02-1993	US 5234824 A	10-08-1993
US 5654179	A	05-08-1997	US 5284940 A	08-02-1994
			US 5620852 A	15-04-1997
			AT 191513 T	15-04-2000
			AU 9058091 A	11-06-1992
			DE 69132098 D1	11-05-2000
			EP 0557448 A1	01-09-1993
			WO 9208807 A1	29-05-1992
WO 0212560	A	14-02-2002	US 6455256 B1	24-09-2002
			AU 8103901 A	18-02-2002
			WO 0212560 A1	14-02-2002

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Intern: s Aktenzeichen  
PCT/EP 01/10363

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/68 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STARBUCK M A B ET AL: "Ultra sensitive detection of Listeria monocytogenes in milk by the polymerase chain reaction (PCR)." LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, Bd. 15, Nr. 6, 1992, Seiten 248-252, XP009005698 ISSN: 0266-8254	1,3,5-9
Y	das ganze Dokument	2,4, 10-13
Y	WO 99 45021 A (CHO RAYMOND J ;AFFYMETRIX INC (US); DAVIS RONALD W (US); WODICKA L) 10. September 1999 (1999-09-10) Seite 16, Zeile 9 - Zeile 12	10-13

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Februar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/02/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luzzatto, E

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Pat. Anzeichen

PCT/EP 01/10363

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 187 083 A (MULLIS KARY B) 16. Februar 1993 (1993-02-16) Spalte 14, Zeile 21 - Zeile 27; Ansprüche 1-5, 21-23; Beispiel 4	2, 4
A	US 5 654 179 A (LIN LILY) 5. August 1997 (1997-08-05) Spalte 14, Zeile 9 - Zeile 47	1-9
E	WO 02 12560 A (GALLO WINERY E & J) 14. Februar 2002 (2002-02-14) das ganze Dokument	1-13

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Anaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: s Aktenzeichen

PCT/EP 01/10363

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WC 9945021	A	10-09-1999	AU	2892199 A	20-09-1999
			WO	9945021 A1	10-09-1999
US 5187083	A	16-02-1993	US	5234824 A	10-08-1993
US 5654179	A	05-08-1997	US	5284940 A	08-02-1994
			US	5620852 A	15-04-1997
			AT	191513 T	15-04-2000
			AU	9058091 A	11-06-1992
			DE	69132098 D1	11-05-2000
			EP	0557448 A1	01-09-1993
			WO	9208807 A1	29-05-1992
WC 0212560	A	14-02-2002	US	6455256 B1	24-09-2002
			AU	8103901 A	18-02-2002
			WO	0212560 A1	14-02-2002